MultiReporter Assay System -Tripluc®-
Tripluc® Luciferase Assay Reagent

100 回用 (Code No. MRA-301)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

－目次－

[1] はじめに…… 2
[2] 製品内容…… 3
[3] ご用意いただくもの…… 3
[4] ルシフェラーゼアッセイ…… 4
1. 試薬の準備…… 4
2. アッセイの方法…… 4
[5] MultiReporter Assay System –Tripluc®–について…… 5
1. ルシフェラーゼ遺伝子…… 5
2. 発光の色分離測定原理…… 6
[6] 使用例…… 8
[7] トラブルシューティング…… 10
[8] 参考文献…… 11
[9] 関連商品…… 12

ご注意

本製品は研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

本システムのルシフェラーゼ遺伝子の使用にあたっては、独立行政法人産業技術総合研究所の許諾を受けています。ルシフェラーゼ遺伝子並びにこれらを用いたマルチ遺伝子転写活性測定技術について、独立行政法人産業技術総合研究所より特許出願中です。産業用利用については別途ライセンスが必要となりますので、弊社までお問い合わせください。

[1] はじめに

リポーター遺伝子を用いた遺伝子発現制御解析は、リポーター遺伝子に連結されたプロモーターなどの転写調節エレメントを含む遺伝子構築物を細胞に導入して、ある条件下において発現されるリポーター酵素の活性を指標に、前記エレメントに起因する遺伝子発現調節を評価する手法です。この方法において問題とされるのは、トランスフェクション効率、細胞数、生育状態、細胞死など、前記エレメントに依存しない、サンプル間の差異です。そのため、恒常発現プロモーターに連結された、基質特異性あるいは反応性の異なるリポーターを内部標準として加え、サンプル間のデータを標準化する手法が用いられてきました。

MultiReporter Assay System –Tripluc®–は、緑色発光ルシフェラーゼ(**G**reen、最大発光波長 550 nm)、橙色発光ルシフェラーゼ(**O**range、580 nm)、赤色発光ルシフェラーゼ(**R**ed、630 nm)の 3 色の発光ルシフェラーゼを用いたマルチ遺伝子転写活性測定システムです(1-4)。これらのルシフェラーゼはいずれも D-ルシフェリンを発光基質として利用するため、色分離測定によって、2 つないし 3 つのリポーター酵素の活性を簡便かつ同時にアッセイすることが可能です。最大 3 つのリポーターをご利用できますので、1 つのリポーターを内部標準に用いても、2 つの被験配列の転写調節を測定することができます。

Tripluc® Luciferase Assay Reagent は、MultiReporter Assay System –Tripluc®–のアッセイに最適化された測定試薬です。

本製品には以下の特長があります。

特長 1　1 ステップアッセイ

従来の 2 液タイプの検出試薬では、細胞溶解と発光反応を別々に行うため、操作が煩雑でした。本製品では、細胞溶解・発光反応に必要な成分を 1 種類の溶液にしましたので、本試薬を添加し、10 分間インキュベートするだけでルシフェラーゼアッセイが可能です。アッセイの際、培地の除去は不要です。

特長 2　安定した発光

試薬組成を最適化し、マルチウェルプレートアッセイが可能になりました。

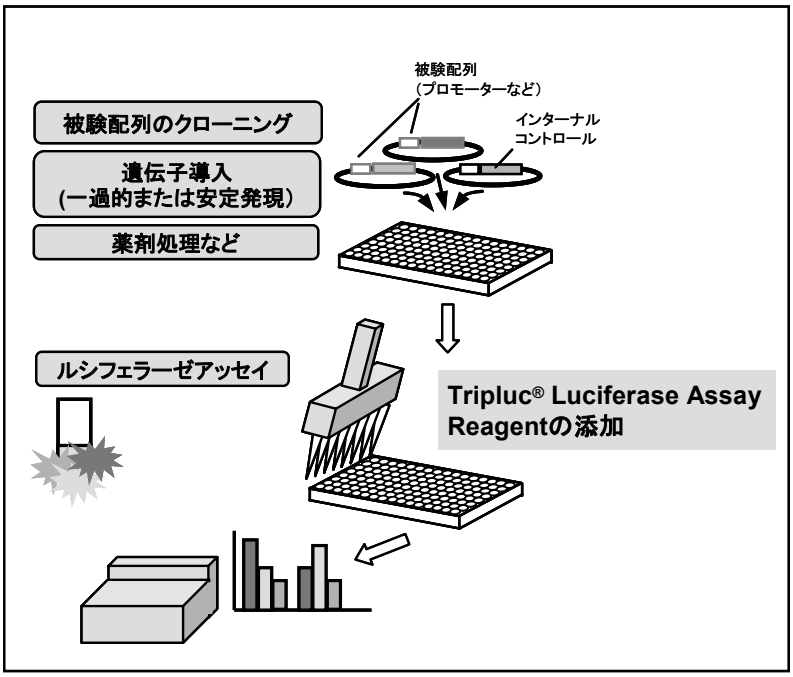


図 1. Tripluc®システムを用いた遺伝子発現解析フロー

[2] 製品内容

品名	サイズ（＊）	Code No.	保存温度
MultiReporter Assay System –Tripluc®– Tripluc® Luciferase Assay Reagent	10ml	MRA-301	-80℃
MultiReporter Assay System –Tripluc®– Tripluc® Luciferase Assay Reagent	10ml × 5	MRA-301X5	-80℃

（＊） 96 ウェルプレートでアッセイを行う場合、MRA-301 は 100 反応分、MRA-301X5 は 500 反応分に相当します。一回の測定で検出するサンプル数が少ない場合には、初回融解時に小分注して凍結保存することをお薦めします（弊社内の検討では 3 回までの凍結融解は品質上問題ないことを確認しております）。

[3] ご用意いただくもの

・プロモーターなど被験配列が挿入された MultiReporter Assay System -Tripluc®-プラスミド

MultiReporter Assay System -Tripluc®-ベクターは本製品に含まれません。「[9]. 関連商品」を参照いただき、別途ご購入ください。

・細胞、培地、トランスフェクション試薬など

・ルミノメーター及び適合する容器

3色のルシフェラーゼ発光の計測には、色分離機能を備えたルミノメーターなどの測定装置が必要です。具体的には下記仕様を備えた装置となります。

(1) 450～750 nm の測定波長レンジを有すること。

(2) 2 つ、または 3 つの適切な光学フィルターを装着できること。

また、プレートリーダーをご利用いただく場合は、白色不透明プレートをご用意ください。

[4] ルシフェラーゼアッセイ

1. 試薬の準備

- ルシフェラーゼの酵素活性は温度によって影響を受けますので、本試薬を十分に室温に戻してご使用ください。
- 本試薬は-80℃で保存し、融解は室温またはそれ以下で行ってください。水浴で融解することをお薦めします。
- 細胞サンプルも室温に戻した後に、試薬を添加してください。

2. アッセイの方法

96 ウェルプレートでの使用例です。

(1) MultiReporter Assay System –Tripluc®-のルシフェラーゼ遺伝子が導入された細胞を培養します。

＊1;細胞培養後、そのまま発光試薬を加えて測定する場合、ご使用の測定機器に適合する白色不透明プレートで培養を行ってください。

＊2;透過率設定のため、各色のルシフェラーゼ遺伝子プラスミドを単独でトランスフェクションしたサンプルをあわせて準備してください。

＊3;より精度の高い測定をしていただくために、SLG、SLO、SLR の発光量ができるだけ同レベルになるようにプラスミドの混合量を調整してください（50 倍以内）。この際、内部標準としては SLG のご使用をお薦めいたします。内部標準として SLG をご使用いただくことで、多くの場合、内部標準として添加するプラスミド量を抑え、被験配列に連結した SLO、SLR の混合量を増やすことができます（結果として、SLG、SLO、SLR の発光量をそろえることが可能です）。

＊4;2 色のアッセイでは SLG と SLR の組み合わせをお薦めいたします。

(2) 細胞を CO_2 インキュベーターから取り出し、室温に戻します。

(3) それぞれのウェルに細胞培養液と等量の本試薬を添加します。

96 ウェルプレートでは、通常 100μl の細胞培養液に 100μl の本試薬を添加します。

(4) 10 分間室温でインキュベートして細胞を完全に溶解します。

この際、振とう機で軽く振とうすると反応液が均一になり、安定した計測が行えます。
また、溶解が十分行われていない場合には、さらに 10 分程度インキュベートしてください。

(5) ルミノメーターで測定します。

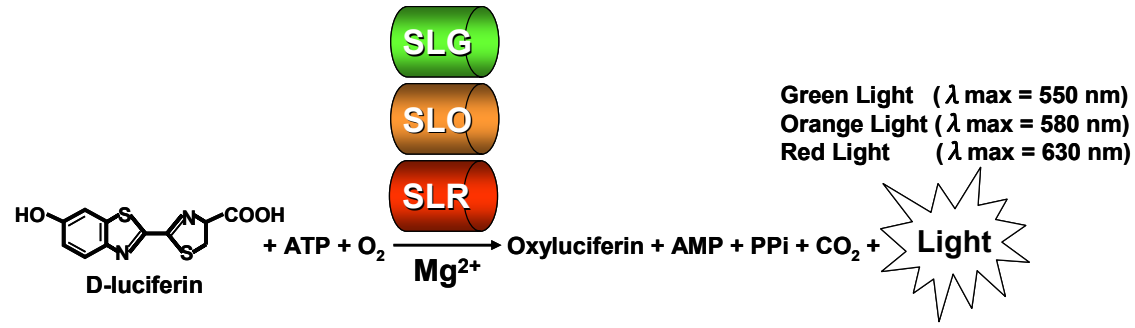
[5] MultiReporter Assay System –Triplu[®]- について

1. ルシフェラーゼ遺伝子

MultiReporter Assay System –Triplu[®]– ベクターシリーズは、緑色発光ルシフェラーゼ(SLG)、橙色発光ルシフェラーゼ(SLO)、赤色発光ルシフェラーゼ(SLR)の 3 色のルシフェラーゼで構成されます(表 1)。これらのルシフェラーゼをコードするルシフェラーゼ遺伝子は、本来、昆虫型コドンユーセージを有するため、哺乳類細胞における発現が低いという問題点がありました。そこで、SLG、SLO、SLR 遺伝子は、発光特性を維持するためアミノ酸配列を変更せずに哺乳類において使用頻度の高いコドンに変更することによって、哺乳類細胞アッセイ用に最適化されています。

表 1. MultiReporter Assay System –Triplu[®]– のルシフェラーゼ遺伝子

		最大発光波長(nm)	由来	アミノ酸配列
緑色発光ルシフェラーゼ	SLG	550	イリオモテボタル	野生型[5]
橙色発光ルシフェラーゼ	SLO	580	イリオモテボタル	変異体 (T226N)[6,7]
赤色発光ルシフェラーゼ	SLR	630	鉄道虫	野生型[8,9,10]



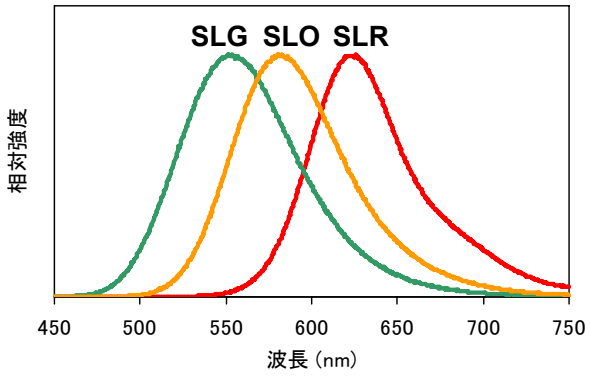


図 2. SLG, SLO, SLR による反応機構(上)と各ルシフェラーゼによる発光スペクトル(左)

2. 発光の色分離測定原理

MultiReporter Assay System –Tripluc®–は、アトー株式会社「ルミネッセンサーMCA」（Code No. AB-2250）、マイクロプレート用「Phelios」(Code No. AB-2350)、あるいは微弱発光対応型マルチラベルプレートリーダー（パーキンエルマー社「ARVO シリーズ」など）のような、色分離機能を備えたルミノメーターを用いることにより測定が可能です。

(1) 2 枚の光学フィルターを使用した 3 色ルシフェラーゼの分離測定

アトー株式会社「ルミネッセンサーMCA」や「Phelios」を用いた測定方法をご紹介します。これらのルミノメーターには、色分離のため、560 nm ロングパスフィルター(560 nm LP、Filter 1)と 600 nm ロングパスフィルター(600 nm LP、Filter 2)が内蔵されています。

まず、SLG、SLO、SLR をそれぞれ単独で発現させた細胞を用いて、①フィルターを用いない測定（全光）、②560 nm LP (Filter 1)透過光の測定、③600 nm LP (Filter 2)透過光の測定を実施し、下記の係数を算出します。

係数名		表記	測定法
SLG	Filter 1 透過率	T1g	SLG 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2g	SLG 全光に対する Filter 2 透過光の割合
SLO	Filter 1 透過率	T1o	SLO 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2o	SLO 全光に対する Filter 2 透過光の割合
SLR	Filter 1 透過率	T1r	SLR 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2r	SLR 全光に対する Filter 2 透過光の割合

3 色のルシフェラーゼを含むサンプル中の SLG、SLO、SLR の発光量を G、O、R とした場合、①フィルターを用いない測定（全光）光量；F0、②560 nm LP (Filter 1)透過光の測定光量；F1、③600 nm LP (Filter 2)透過光の測定光量；F2 は下記のように記述されます。

$$F0 = G + O + R$$

$$F1 = T1g \times G + T1o \times O + T1r \times R$$

$$F2 = T2g \times G + T2o \times O + T2r \times R$$

つまり、各係数を決定し、F0、F1、F2 を測定することによって、G、O、R は下記のように算出されます。

$$G = \frac{(T1o \times T2r - T1r \times T2o) \times F0 + (T2o - T2r) \times F1 + (T1r - T1o) \times F2}{T1g \times T2o + T1r \times T2g + T1o \times T2r - T1g \times T2r - T1r \times T2o - T1o \times T2g}$$

$$O = \frac{(T1r \times T2g - T1g \times T2r) \times F0 + (T2r - T2g) \times F1 + (T1g - T1r) \times F2}{T1g \times T2o + T1r \times T2g + T1o \times T2r - T1g \times T2r - T1r \times T2o - T1o \times T2g}$$

$$R = \frac{(T1g \times T2o - T1o \times T2g) \times F0 + (T2g - T2o) \times F1 + (T1o - T1g) \times F2}{T1g \times T2o + T1r \times T2g + T1o \times T2r - T1g \times T2r - T1r \times T2o - T1o \times T2g}$$

これらの測定機では、係数を予め入力し、G、O、R を自動で算出することが可能です。

＊ 上記測定原理は、アトー株式会社より特許出願されています。

＊＊ 2 色の場合の分離測定には、560 nm LP (Filter 1)または 600 nm LP (Filter 2)のいずれかのフィルター、及び全光の測定で色分離測定が行えます。SLG 及び SLR、SLO 及び SLR をご使用の場合は 600 nm LP (Filter 2)を、SLG 及び SLO をご使用の場合は 560 nm LP (Filter 1)を選択いただくことをお薦めいたします。

(2) 3 枚の光学フィルターを用いた 3 色ルシフェラーゼの分離測定(*)

パーキンエルマー社「ARVO シリーズ」を用いた測定方法をご紹介します。測定用フィルターとして、①波長 510nm:半値幅 60nm（Filter1)、②595nm:60nm（Filter2)、③660nm:100nm（Filter3)を使用します。

まず、SLG、SLO、SLR をそれぞれ単独で発現させた細胞を用いて、①フィルターを用いない測定(全光)、②Filter 1 透過光の測定、③Filter 2 透過光の測定、④Filter 3 透過光の測定を実施し、下記の係数を算出します。

係数名		表記	測定法
SLG	Filter 1 透過率	T1g	SLG 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2g	SLG 全光に対する Filter 2 透過光の割合
	Filter 3 透過率	T3g	SLG 全光に対する Filter 3 透過光の割合
SLO	Filter 1 透過率	T1o	SLO 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2o	SLO 全光に対する Filter 2 透過光の割合
	Filter 3 透過率	T3o	SLO 全光に対する Filter 3 透過光の割合
SLR	Filter 1 透過率	T1r	SLR 全光に対する Filter 1 透過光の割合
	Filter 2 透過率	T2r	SLR 全光に対する Filter 2 透過光の割合
	Filter 3 透過率	T3r	SLR 全光に対する Filter 3 透過光の割合

3 色のルシフェラーゼを含むサンプル中の SLG、SLO、SLR の発光量を G、O、R とした場合、①Filter 1 の測定光量;F1、②Filter 2 の測定光量;F2、③Filter 3 の測定光量;F3 は下記のように記述されます。

$$\begin{pmatrix} F1 \\ F2 \\ F3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T1g & T1o & T1r \\ T2g & T2o & T2r \\ T3g & T3o & T3r \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

つまり、各係数を決定し、F0、F1、F2 を測定することによって、G、O、R は下記のように算出されます。

$$\begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T1g & T1o & T1r \\ T2g & T2o & T2r \\ T3g & T3o & T3r \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F1 \\ F2 \\ F3 \end{pmatrix}$$

この計算は、Microsoft® Excel を用いて行うことができます。下記の Microsoft® Excel の関数をご利用ください。

逆行列の算出

算出結果(逆行列)を表示するセル(「3 行×3 列」の範囲)を指定後、「MININVERSE」関数を選択し、元になる配列(「3 行×3 列」の範囲)を指定し、「Ctrl キー+ Shift キー」を押しながら「OK」をクリックします。

行列計算

算出結果を表示するセル(「3 行×1 列」の範囲)を指定後、「MMULT」関数を選択し、透過率の逆行列(「3 行×3 列」の範囲)及び測定値の行列(「3 行×1 列」の範囲)の配列 2 つを指定後、「Ctrl キー + Shift キー」を押しながら「OK」をクリックします。

＊ Microsoft® Excel を用いた演算シートを弊社ウェブサイトに掲載しております。ダウンロードして、ご利用ください。

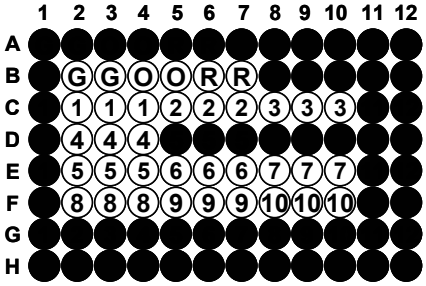
[6] 使用例

MultiReporter Assay System –Tripluc®-を用いて、転写因子 AP1、NFκB の活性化を同時にモニターした例をご紹介します。

1. 被験配列のクローニング

pSLO-test (Code No. MRV-102)、pSLR-test (Code No. MRV-103)の各ルシフェラーゼ遺伝子の上流に HSVtk プロモーターを挿入し、そのさらに上流に AP1 結合配列（5'-ATGAGTCAA-3'、6 コピー）、NFκB 結合配列（5'-CGGAAAGTCCCA-3'、6 コピー）をそれぞれ挿入した、pAP1-SLO、pNFκB-SLR を構築しました。

2. トランスフェクション



96 ウェル白色不透明プレート（ナルジェ・ヌンク社、Code No. 136101）に HeLa S3 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^4 cells （100µl DMEM+10% FBS）播種し、24 時間培養しました。翌日、1 ウェルあたり、0.09µg pAP1-SLO、0.02µg pNFκB-SLR、及びインターナルコントロールとして 0.09µg pSLG-HSVtk control (Code No. MRV-301)を混合し(*1)、さらに 0.5µl Lipofectamine™ 2000 （インビトロジェン社）と混合した後、右図 No.1～10 のウェルの細胞に添加しました。

また、各ルシフェラーゼのフィルター透過率を決定するために、上図 G、O、R に、pSLG-SV40 control (Code No. MRV-201)、pSLO-SV40 control (Code No. MRV-202)、pSLR-SV40 control (Code No. MRV-203)をそれぞれ 0.2µg トランスフェクションしました(*2)。

この細胞を 37℃、5% CO_2 下で 24 時間インキュベートしました。

*1; SLG、SLO、SLR の各プラスミドの添加量はシグナル強度差が小さくなるように調整することをお薦めします（50 倍以内を目安）。

*2; pSLG-SV40 control、pSLO-SV40 control、pSLR-SV40 control をお持ちでない場合は、お手持ちの各ルシフェラーゼを発現するプラスミドのうち、できるだけ発現の高いコンストラクトを代わりにご使用ください。

3. 細胞の刺激処理

トランスフェクションを行った細胞の培養液を除去し、下表に示す濃度の TNFα や PMA を添加した DMEM + 10% FBS 培地を各 100µl 加え、さらに 37℃で 5 時間インキュベートしました。

G、O、R についても同様に DMEM + 10% FBS 培地に置換しました。

表. 刺激条件

No.	刺激条件
1	-
2	1nM PMA
3	10nM PMA
4	100nM PMA

No.	刺激条件
5	-
6	0.001ng/ml TNFα
7	0.01ng/ml TNFα
8	0.1ng/ml TNFα
9	1ng/ml TNFα
10	10ng/ml TNFα

4. ルシフェラーゼアッセイ

細胞を CO_2 インキュベーターより取り出し、室温に戻した後、培地はそのまま、培地と等量の Tripluc® Luciferase Assay Reagent を加え、10 分間インキュベートしました。その後、パーキンエルマー社 ARVOMX にセットし、光学フィルター①660nm:半値幅 100nm（Filter3）、②595nm：半値幅 60nm（Filter2）、③波長 510nm：半値幅 60nm（Filter1）存在下でそれぞれ、2sec/ウェルで測定しました。G、O、R についてはさらに、フィルター非存在下で全光を測定しました。

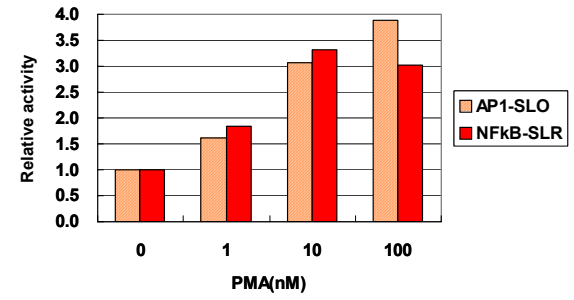
[5] 2. (2) (p. 7)の演算方法に従って、まず、G、O、R のウェルの測定値から、それぞれのルシフェラーゼのフィルター透過率（例えば Filter1 透過率は、Filter1 測定値／Filter 非存在下測定値）を決定しました。続いて、試験ウェル（no.1～10）の測定値から各ルシフェラーゼの活性値を算出しました(*1)。SLO、SLR の活性値をインターナルコントロールである SLG の活性値で割り返し、サンプル間の標準化を行いました。N=3 の平均値を算出し、SLO/SLG、SLR/SLG について、それぞれ薬剤処理のないサンプルの値を 1 として下図グラフにプロットしました。

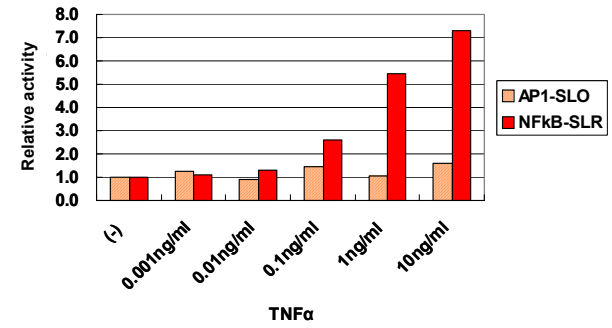
*1；Microsoft® Excel を用いた演算シートを弊社ウェブサイトに掲載しております。ダウンロードして、ご利用ください。

5. 結果

PMA で刺激した場合、AP1、NFκB ともに濃度依存的な活性化を認めることができました。

一方、TNFα で刺激した場合、AP-1 の活性化はほとんど認められず、NFκB については TNFα 濃度依存的な活性化を確認することができました。





[7] トラブルシューティング

現象	原因と対応
シグナルが検出できない、または低い	・ もともと発現の低いプロモーターの可能性があります。 ・ トランスフェクション試薬あるいは条件が不適当な可能性があります。試薬や条件を変えて実施してください。 ・ プラスミドの純度が低い可能性があります。Endotoxin の混入が少なくなるように再精製してください。 ・ 細胞溶解が不十分な可能性があります。試薬が全体に行き渡っているか確認してください。さらに、処理時間を 5～10 分程度延長してください。 ・ ルシフェラーゼが失活した可能性があります。室温で長時間放置しないでください。 ・ 試薬が劣化した可能性があります。新しい試薬で実施してください。
定量性が悪い	・ シグナルが低く、ノイズの影響を受けている可能性があります。読取り時間を伸ばす、またはシグナルが高くなるように実験条件を最適化してください。 ・ 発光色間のシグナルレベルの差が大きすぎる可能性があります。トランスフェクションの際のプラスミドの混合比を調整してください（50 倍以内を目安）。 ・ サンプル間で補正していない、あるいは補正の方法が不適当な可能性があります。内部標準で必ず補正してください。実験条件によっては、コントロールプロモーターの転写活性が変動する可能性があります。コントロールプロモーターを変更して実施してください。 ・ 試薬が室温に戻っていない可能性があります。室温に戻してください。 ・ 試薬が劣化した可能性があります。新しい試薬で実施してください。
再現性がない	・ 細胞の培養条件、処理条件など、実験条件にばらつきがある可能性があります。実験条件を確認してください。 ・ ルミノメーターの不調の可能性があります。ルミノメーターの動作確認を実施してください。

[8] 参考文献

1. Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, A., Kubota, H., Ikeda, M. and Ohmiya, Y. (2005) *BioTechniques*, **38**, 891-894
2. 中島芳浩、菅田和法、近江谷克裕 (2005) *バイオテクノロジージャーナル*, **7-8**, 453-455
3. Asai, T. et al., Berthold, A. and Ohmiya (2007) *Proceeding of the 14th International Symposium on BIOLUMINESCENCE AND CHEMILUMINESCENCE* (World Scientific), 177-180
4. 浅井友実、西井重明、近江谷克裕 (2007) *「動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス」*(シーエムシー出版)、235-243
5. Ohmiya, Y., Sumiya, M., Viviani, V.R., and Ohba, N.(2000) *Sci. Rept. Yokosuka City Mus.* **47**, 31-38
6. Viviani, VR., Uchida, A., Suenaga, N., Ryufuku, M., and Ohmiya, Y.(2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1286-1291
7. Viviani, VR., Uchida, A., Viviani W., and Ohmiya, Y. (2002) *Photochem. Photobiol.* **76**, 538-544
8. Viviani, VR., EJH, Bechaera, and Ohmiya, Y.(1999) *Biochemistry,* **38**, 8271-8279
9. Nakajima, Y., Kimura, T., Suzuki, C., and Ohmiya, Y. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 948-951
10. Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y. and Honma, K. (2004) *FEBS Letters* **565**, 122-126

[9] 関連商品

品名	内容	Code No.
SLG プロモーター挿入用ベクター **pSLG-test**	20μg	MRV-101
SLO プロモーター挿入用ベクター **pSLO-test**	20μg	MRV-102
SLR プロモーター挿入用ベクター **pSLR-test**	20μg	MRV-103
SLG SV40 コントロールベクター **pSLG-SV40 control**	20μg	MRV-201
SLO SV40 コントロールベクター **pSLO-SV40 control**	20μg	MRV-202
SLR SV40 コントロールベクター **pSLR- SV40 control**	20μg	MRV-203
SLG HSVtk コントロールベクター **pSLG-HSVtk control**	20μg	MRV-301
SLG/SLO/SLR プロモーター挿入用ベクターセット pSLG-test, pSLO-test, pSLR-test	各 20μg	MRV-111
SLG/SLO/SLR SV40 コントロールプロモーターベクターセット pSLG-SV40 control, pSLO-SV40 control, pSLR-SV40 control	各 20μg	MRV-211
SLG/SLO/SLR ベクターフルセット pSLG-test, pSLO-test, pSLR-test, pSLG-SV40 control, pSLO-SV40 control, pSLR-SV40 control pSLG-HSVtk control	各 20μg	MRV-311
D-luciferin（カリウム塩）	20 mg	MRL-101
D-luciferin（カリウム塩）	20 mg×5	MRL-101X5

【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目 10 番 2 号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio